



小白菊内酯对白血病 K562 细胞及其干细胞的作用

易娟¹, 陈静¹, 孙静¹, 魏虎来^{1*}, 石建功²

(1. 兰州大学基础医学院医学实验中心 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000;
2. 北京协和医学院 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100005)

[摘要] **目的:**研究小白菊内酯(parthenolide, PTL)对白血病 K562 细胞及其白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)的作用。**方法:**以白血病 K562 细胞为靶细胞,四氮唑蓝(MTT)比色法测定细胞增殖活性,Annexin V/PI 染色法测定细胞凋亡;流式细胞术检测 LSC 相对含量,甲基纤维素集落形成法检测细胞的自我更新和增殖能力。**结果:**PTL 显著抑制 K562 细胞的增殖,24,48,72 h 的 IC₅₀分别为 17.1, 8.67, 9.42 μmol·L⁻¹。5, 10 μmol·L⁻¹ PTL 处理 48 h, K562 细胞的凋亡率分别为 (49.56 ± 5.11)%, (71.88 ± 2.12)%。结合干细胞免疫标志分析, K562 细胞中 LSC 样(CD34⁺CD38⁻)细胞的凋亡率分别为 (52.63 ± 4.14)%, (57.50 ± 4.47)%。K562 细胞中 LSC 的相对含量仅轻度增高,但高浓度(15 μmol·L⁻¹)PTL 处理, LSC 含量则增高 15 倍。0.5 ~ 4.0 μmol·L⁻¹ PTL 显著抑制 K562 细胞的集落形成能力,集落数降低 24.1% ~ 89.2%; 5 ~ 15 μmol·L⁻¹ PTL 预处理,存活 K562 细胞的集落形成数增高 5.0% ~ 50.0%。**结论:**小白菊内酯可抑制 K562 细胞及其干细胞的增殖活性,并诱导其凋亡。

[关键词] 白血病干细胞;小白菊内酯;集落形成;凋亡

白血病干细胞(leukemia stem cells, LSC)起源于正常造血干细胞或由处在某个分化阶段的造血细胞转化而来,其特异性免疫标志为 CD34⁺CD38⁻CD123⁺;LSC 具有自我更新能力和无限增殖能力,且天然对抗癌药物和放射线耐受,有很强的生存优势,能在化疗和放疗后生存下来而成为复发的根源^[1-3]。小白菊内酯(parthenolide, PTL)是植物药野甘菊的主要活性成分,属于倍半萜烯内酯化合物,近来研究发现小白菊内酯具有较强的抗肿瘤活性,可诱导结肠癌、肝癌、多发性骨髓瘤、白血病等肿瘤细胞凋亡,并对其他抗癌药物具有增敏效应^[4-5]。本研究观察 PTL 对白血病 K562 细胞及其 LSC 的杀伤效应。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 小白菊内酯(BIOMOL 公司); RPMI 1640(美国 Gibco 公司);新生小牛血清(兰州

荣晔生物科技有限责任公司);甲基纤维素(4000CPS,美国 AMRESCO 公司);PEcy5 标记的鼠抗人 CD34 抗体、FITC 标记的鼠抗人 CD38 抗体、ECD 标记的鼠抗人 CD38 抗体均购自 Caltag 公司;PE 标记的鼠抗人 CD123 抗体购自 eBioscience 公司;PE 标记的鼠抗人 IgG1, ECD 标记的鼠抗人 IgG1, FITC 标记的鼠抗人 IgG1 和 PEcy5 标记的鼠抗人 IgG1 为 Caltag 公司产品;Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自 eBioscience 公司。自动酶标仪(Bio-Tek Power wave X);流式细胞仪(FCM, Beckman-Coulter Epics XL),倒置显微镜(Olympus IX81)。

1.2 靶细胞和细胞培养 K562 细胞由兰州大学医学实验中心保存。细胞接种于含 15% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37 °C, 5% CO₂ 和全湿条件下培养,取对数生长期细胞用于试验。

1.3 K562 细胞增殖活性的测定 K562 细胞(1 × 10⁵ 个/mL)接种于 96 孔培养板中,加入不同浓度的 PTL,培养 24, 48, 72 h 后 MTT 法^[6]检测。自动酶标仪于 570 nm 处测吸光度 A 值,计算细胞增殖抑制率(inhibition rate)和半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.4 Annexin V/PI 双标记检测 K562 细胞的凋亡 收集 PTL 处理的 K562 细胞, PBS 洗涤,调整细胞为 1 × 10⁶ 个/mL,加入 FITC 标记的 Annexin V 和 PI,室温避光染色,流式细胞仪检测正常、早期凋亡

[收稿日期] 2009-03-12

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(096RJZA034);中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室(北京协和医学院)开放课题(0801);甘肃省新药临床前研究重点实验室(兰州大学)开放课题(GSKFKT-0802)

[通信作者] * 魏虎来, Tel: (0931)8915082, Fax: (0931)8915082, E-mail: weihulai@lzu.edu.cn

[作者简介] 易娟, 助理研究员, E-mail: yij@lzu.edu.cn



和晚期凋亡细胞^[7]。

1.5 Annexin V 标记检测 CD34⁺ CD38⁻ 细胞的凋亡 收集 PTL 处理的 K562 细胞, PBS 洗涤, 调整细胞为 1 × 10⁶ 个/mL, 加入 CD34-PEcy5 和 CD38-ECD, 室温避光孵育, PBS 洗涤, 重悬于结合缓冲液中, 再加入 FITC 标记的 Annexin V, 室温避光染色 15 min, 细胞重悬, FCM 检测 CD34⁺ CD38⁻ 细胞中的凋亡 (Annexin V⁺) 细胞。以 PEcy5, ECD, FITC 标记的鼠抗人 IgG1 分别为同型对照, 检测重复 3 次。

1.6 LSC 相对含量检测 分别收集对照及 PTL 处理的 K562 细胞, 调整细胞为 1 × 10⁶ 个/mL, 每检测管均加入 CD34-PEcy5, CD38-FITC, CD123-PE, 室温避光孵育 20 min, PBS 洗涤, 重悬于 PBS 中, FCM 检测^[8]。以 PEcy5, PE, FITC 标记的鼠抗人 IgG1 为同型对照, 检测重复 3 次。

1.7 甲基纤维素半固体培养检测集落形成 取对数生长期的 K562 细胞, 按 1 × 10³ 个/mL 接种于含 20% 小牛血清、2 mmol · L⁻¹ L-谷氨酰胺、5 μmol · L⁻¹ β-巯基乙醇和 0.9% 甲基纤维素的半固体培养基。分别接种于 24 孔细胞培养板, 每孔分别加入终浓度为 0.5, 1, 2, 4 μmol · L⁻¹ 的 PTL, 每个浓度设 3 个复孔。37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 10 d, 倒置显微镜下计数集落形成的数目并观察其形态, 以大于 40 个细胞的细胞团为 1 个集落^[8-9]。实验重复 3 次。K562 细胞经 5, 7.5, 10, 15 μmol · L⁻¹ PTL 预处理 48 h, 收集, 台盼蓝染色重新计数活细胞, 按 1 × 10³ 个/mL 接种于 0.9% 甲基纤维素半固体培养基培养 10 d。倒置显微镜下计数集落数和观察集落形态^[8-9]。

1.8 统计学分析 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 组间均数差异性采用 *t* 检验; 相关性分析采用直线回归。

2 结果

2.1 PTL 抑制 K562 细胞的增殖活性 PTL 呈浓度依赖性地抑制 K562 细胞增殖, 24, 48, 72 h 的 IC₅₀ 分别为 17.1, 8.67, 9.42 μmol · L⁻¹ (图 1, *P* < 0.01)。

2.2 PTL 对 K562 细胞及其 LSC 样细胞的凋亡诱导效应 K562 细胞经 5, 10 μmol · L⁻¹ PTL 处理 48 h, Annexin V/PI 染色显示凋亡细胞明显增高, 细胞总凋亡率 (早期凋亡率 + 晚期凋亡率) 分别较对照细胞提高 107.8 倍和 156.3 倍, 细胞凋亡以早期凋亡为主 (表 1, *P* < 0.01); 结合 CD34 和 CD38 免疫

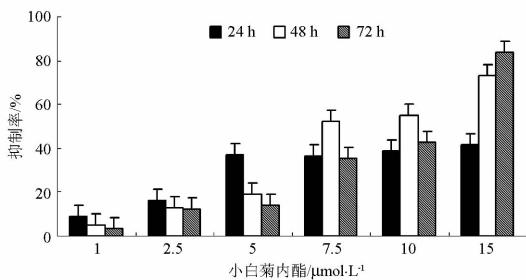


图 1 PTL 对 K562 细胞增殖的抑制作用

标记分析, K562 细胞中 LSC 样 (CD34⁺ CD38⁻) 细胞群中的凋亡 (Annexin V⁺) 细胞分别增高 169.8 倍和 185.5 倍 (表 1, *P* < 0.01)。提示 PTL 可诱导 K562 细胞及其白血病干细胞凋亡。

表 1 PTL 诱导后 K562 细胞及其干细胞的凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PTL / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	K562 细胞 /%	CD34 ⁺ CD38 ⁻ 细胞 /%
0	0.46 ± 0.13	0.31 ± 0.27
5	49.56 ± 5.11 ¹⁾	52.63 ± 4.14 ¹⁾
10	71.88 ± 2.12 ¹⁾	57.50 ± 4.47 ¹⁾

注: 与对照 (0 μmol · L⁻¹) 比较¹⁾ *P* < 0.01。

2.3 PTL 对 K562 细胞中 CD34⁺ CD38⁻ CD123⁺ 细胞相对含量的影响 5, 10, 15 μmol · L⁻¹ PTL 作用 48 h 后, K562 细胞中 CD34⁺, CD123⁺, CD34⁺ CD38⁻ 以及 CD34⁺ CD38⁻ CD123⁺ 细胞 (LSC) 的相对比例 (含量) 均不同程度地增高, 但增高的幅度并不显著; 高浓度 (15 μmol · L⁻¹) PTL 处理后则显著增高 (表 2, *P* < 0.01)。提示 PTL 对 K562 细胞群中的原始/幼稚细胞及白血病干/祖细胞均有杀伤效应, 但仍然无法根除 LSC, 部分 LSC 残留而使其相对含量提高。

2.4 PTL 抑制 K562 细胞的集落形成能力 0.5 ~ 4 μmol · L⁻¹ 的 PTL 直接作用可显著抑制 K562 细胞集落的形成, 集落形成率降低可达 89.16% (表 3, *P* < 0.01)。5 ~ 15 μmol · L⁻¹ PTL 预处理 48 h, 存活 K562 细胞的集落形成数则明显增高, 最高可达对照的 1.5 倍 (表 3)。细胞集落较小、组成细胞数较少, 致密呈球形, 延长培养时间会进一步增大 (图 2)。实验结果说明 PTL 对 K562 细胞中具有自我更新和高增殖潜能的细胞 (LSC) 具有较好的杀伤效应。

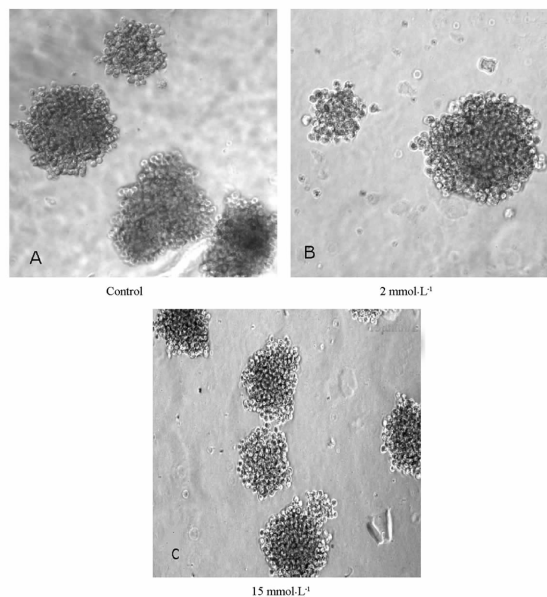
表 2 PTL 对 K562 细胞中 LSC 相对含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PTL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CD34 ⁺	CD123 ⁺	CD34 ⁺ CD123 ⁺	CD34 ⁺ CD38 ⁻	CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD123 ⁺
0	4.37 ± 0.61	4.57 ± 1.12	2.33 ± 0.15	3.93 ± 0.67	1.40 ± 0.26
5	2.27 ± 0.64 ¹⁾	4.43 ± 1.09	1.43 ± 0.21 ¹⁾	2.10 ± 0.61 ¹⁾	1.27 ± 0.15
10	6.57 ± 0.57 ¹⁾	2.63 ± 0.87 ¹⁾	2.37 ± 0.65	6.37 ± 0.40 ¹⁾	1.53 ± 0.31
15	38.73 ± 0.64 ²⁾	31.90 ± 1.21 ²⁾	29.30 ± 1.92 ²⁾	31.83 ± 3.33 ²⁾	22.40 ± 2.46 ²⁾

注:与对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 PTL 对 K562 细胞集落形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	集落数/ $\times 10^3$
PTL 直接作用	0	27.67 ± 2.52
	0.5	26.67 ± 4.93
	1.0	21.00 ± 3.00 ¹⁾
	2.0	13.33 ± 1.53 ²⁾
	4.0	3.00 ± 1.00 ²⁾
PTL 预处理	0	20.00 ± 4.58
	5.0	20.00 ± 7.09
	7.5	21.00 ± 4.93
	10.0	25.00 ± 4.00 ¹⁾
	15.0	30.00 ± 9.07 ¹⁾



A. 对照; B. 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTL 直接作用;
C. 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTL 预处理。

图 2 PTL 作用后 K562 细胞的集落形态($\times 10$)

3 讨论

LSC 生物学特性的深入研究证实 LSC 与白血病发生、复发和耐药性关系密切^[8]。传统的化疗药物只针对活跃在细胞周期中的白血病原始/幼稚细胞,而对处在细胞周期静止(G_0)期的 LSC 作用极其

有限。LSC 特殊的生物学特性,可使其逃脱传统化疗药物或放射线的杀伤作用而存活下来,导致白血病的耐药性及复发^[1-3,5,8,10]。近年来国内外学者尝试寻找药物或措施来清除 LSC,如 ABC 转运体的抑制剂、靶向 LSC 表面分子和其增殖分化信号传导通路调控分子的药物等,以期通过清除 LSC 来达到根除白血病的目的^[10-11]。

本研究证实,PTL 不仅抑制 K562 细胞的增殖和诱导其凋亡,而且能较好地诱导 K562 细胞中 LSC 样(CD34⁺ CD38⁻)细胞凋亡。不同浓度 PTL 作用后,K562 细胞中 LSC (CD34⁺ CD38⁻ CD123⁺)的相对含量有所增高,证实 PTL 对 K562 细胞群中 LSC 及其分化了的白血病原始/幼稚细胞均具有杀伤效应,但分化成熟白血病细胞对 PTL 的敏感性要高于 LSC,PTL 无法彻底根除 LSC,部分残存下来而使其相对含量有所增高。

甲基纤维素半固体集落形成(CFU)实验是体外检测细胞自我更新和增殖潜能的有效方法,短期培养出现的早期集落多由分化阶段较晚、增殖能力有限的细胞形成,而长期培养的晚期集落则主要由干/祖细胞形成,反映的是干细胞的自我更新能力和增殖潜能^[8-9]。本研究中 0.5 ~ 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PTL 直接作用可显著抑制 K562 细胞集落的形成,而用 5 ~ 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PTL 预处理,存活 K562 细胞的集落形成数则明显增高,这是由于 PTL 预处理清除了较敏感的分化成熟后白血病细胞,存活 K562 细胞中 LSC 相对数量增加而使集落形成数量增高。提示 PTL 可杀伤 K562 细胞中具有自我更新和高增殖潜能的 LSC 细胞群,但仍会有部分对 PTL 具有抗性的 LSC 残存下来。提示 PTL 对 LSC 具有较高水平的杀伤效应,但并不能完全清除。有关 PTL 对白血病干细胞的直接作用及其分子机制,有待分选、纯化 LSC 后进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Jordan C T. Cancer stem cell biology: From leukemia to solid



- tumors[J]. *Curr Opin in Cell Biol*, 2004, 16(6): 708.
- [2] Ravandi V, Estrov Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2): 340.
- [3] de Figueiredo-Pontes L L, Pintao M C, Oliveira L C, et al. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(3): 163.
- [4] Knight D W. Feverfew: Chemistry and biological activity[J]. *Nat Prod Rep*, 1995, 12: 271.
- [5] Zhang S, Lin Z N, Yang C F, et al. Suppressed NF- κ B and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF- α -induced apoptosis in human cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 2191.
- [6] Wei H L, Su H X, Yao X J. Biological feature of human T-activated killer cells[J]. *Chin J Cancer Res*, 1999, 11(2): 111.
- [7] Wilkins R C, Kutzner B C, Truong M, et al. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: Flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay[J]. *Cytometry*, 2002, 48(1): 14.
- [8] 易娟, 陈静, 孙静, 等. 白血病 K562/ADM 细胞耐药性与白血病干细胞及耐药蛋白表达的关系[J]. *中华医学杂志*, 2009, 89(25): 1741.
- [9] Smyth M J, Krasovskis E, Sutton V R, et al. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis[J]. *Pro Natl Acad Sci*, 1998, 95(12): 7024.
- [10] Eyles C E, Rich J N. Survival of the fittest: Cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis[J]. *Clin Oncol*, 2008, 26: 2839.
- [11] 储亮, 黄强, 董军, 等. 肿瘤干细胞的耐药性及其治疗策略[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25(11): 868.

Effect of parthenolide on leukemia K562 cells and its leukemia stem cells

YI Juan¹, CHEN Jing¹, SUN Jing¹, WEI Hulai^{1*}, SHI Jiangong²

(1. Laboratory Center for Medical Science, School of Medicine, Lanzhou University, Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou 73000, China;
2. Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory and apoptosis-inducing effects of parthenolide (PTL) on human leukemia K562 cells and its leukemia stem cells (LSC). **Method:** MTT assay was used to detect the proliferating activity of K562 cells, and the cellular apoptosis was assayed with Annexin V/PI double staining. Flow cytometry (FCM) was employed to determine the relative proportion of LSC in K562 cells. The self-renewal and proliferating potential were examined with methylcellulose colony-forming units (CFU) assay. **Result:** By use of MTT assay, we found PTL had significant inhibitory effect on the proliferation of K562 cells, the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were 17.1, 8.67, 9.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24, 48 and 72 h, respectively. After administration with 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTL, the apoptotic rate of K562 cells was (49.56 \pm 5.11)% and (71.88 \pm 2.12)%, and (52.63 \pm 4.14)% and (57.50 \pm 4.47)% in LCS-like (CD34⁺CD38⁻) cells in K562 cell population, respectively. A slightly increase of relative content of LSC in K562 cells was observed. There was an 15-fold increase in the higher concentration of the PTL-treated cells. The methylcellulose colony-forming units assay showed a 24.1% to 89.2% decrease in the CFU of K562 cells administrated with 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to 4.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTL, and the CFU of the surviving cells increased by 5.0% to 50.0% on condition that K562 cells were pre-treated with 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PTL for 48 h. **Conclusion:** PTL eminently inhibits proliferation of K562 cells and LSC in K562 cells, and induces the cell apoptosis.

[Key words] leukemia stem cells; parthenolide; colony formation; apoptosis

doi: 10.4268/cjcm20100223

[责任编辑 张宁宁]